

# Gene annotation and structural analysis of the AvrRvi1 region in *Venturia inaequalis*

**Doctoral Thesis****Author(s):**

Di Gennaro, Fabienne

**Publication date:**

2012

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007619052>

**Rights / license:**

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

DISS. ETH Nr. 20688

# **Gene annotation and structural analysis of the *AvrRvi1* region in *Venturia inaequalis***

A dissertation submitted to

**ETH ZÜRICH**

For the degree of

**Doctor of Sciences**

Presented by

**DI GENNARO FABIENNE LAURA**

Msc UZH in Natural Sciences, University of Zürich

Born February 15<sup>th</sup>, 1981

Citizen of Au-Heerbrugg (SG)

Accepted on the recommendation of

**Prof. Dr. Cesare Gessler, examiner**

**Prof. Dr. Ottmar Holdenrieder, co-examiner**

**Prof. Dr. Beat Keller, co-examiner**

2012

## ZUSAMMENFASSUNG

Der Apfelschorf zählt zu den wichtigsten pilzlichen Krankheiten, die Apfelbäume (*Malus x domestica*) befallen. Die Krankheit wird vom Ascomyceten *Venturia inaequalis* verursacht. Diese Krankheit ist im Obstbau für hohe ökonomische Einbussen verantwortlich. Sie wird heutzutage mit Fungiziden bekämpft, was hohe Kosten zur Folge hat und Risiken für Mensch und Umwelt beinhaltet. Es wird angenommen, dass *V. inaequalis* während dem Pflanzenbefall Stoffe (Effektoren) sekretiert. Wenn die Pflanze ein Resistenzgen trägt, welches einen dieser Effektoren in einer Gen-für-Gene Interaktion erkennt, kann dadurch eine Resistenzreaktion ausgelöst werden. Effektoren, die von Resistenzgenen erkannt werden, heißen Avirulenzfaktoren. Apfelbäume, die Resistenzgene tragen, sind eine mögliche Lösung, die häufige Bekämpfung mit Fungiziden zu ersetzen. Wie lange ein Resistenzgen im Feld eine Resistenz aufrecht erhalten kann, hängt davon ab, wie einfach ein Avirulenzfaktor mutieren kann (welche Fitnesskosten eine solche Mutation verursacht) und somit nicht mehr vom Resistenzgen erkannt wird. Zusätzlich ist es wichtig, wie rasch die Häufigkeit des mutierten Avirulenzfaktors durch Selektion zunimmt. Bis heute wurde noch nie ein Avirulenzgen in *V. inaequalis* kloniert. In dieser Arbeit beschäftigten wir uns mit dem Avirulenzgen *AvrRvi1*. Dieses Gen kodiert für den Avirulenzfaktor, welcher auf der Sorte 'Golden Delicious' (die das Resistenzgen *Rvi1* trägt) eine Resistenzreaktion auslöst. Mittels Shotgun-Sequenzierung wurde in einer früheren Studie eine 330 kb lange Genomregion, welche das Gen beinhaltet, sequenziert. In dieser Arbeit wurde versucht, aus 40 Genen, mögliche Kandidatengene für *AvrRvi1* mittels RT-PCR und Hybridisierungsexperimenten einzugrenzen. Dies gelang uns mit diesen Methoden nicht. Aus weiteren Analysen ging hervor, dass die untersuchte Genomregion aus drei GC-reichen (Guanin, Cytosin) und zwei AT-reichen (Adenin, Thymin) Abschnitten besteht. Die AT-reichen Abschnitte beinhalten Relikte transposabler Elemente und wurden in virulenten Isolaten nicht gefunden. Des Weiteren wurden mit Computerprogrammen 50 Gene vorhergesagt. Die Präsenz von 35 Genen wurde mittels Analysen des Transkriptoms eines virulenten Isolates bestätigt. Von diesen 35 Genen zeigten 16 Unterschiede zwischen virulenten und avirulenten Isolaten, und könnten somit mögliche Avirulenzgene sein. Unter den 16 Kandidaten, war kein Gen vorhanden, das für einen typischen Avirulenzfaktor kodiert (klein, sekretiert, mit vielen Cysteinen).

Hingegen, wurde ein Genkomplex gefunden, welcher an der Synthese eines Sekundärmetaboliten (eines Non-ribosomalem Peptids) beteiligt ist. Während der Infektion werden die meisten Gene des Komplexes stärker exprimiert als *in vitro*. Fünf Gene aus dem Komplex wurden ausgewählt, um mittels RNA-interferenz (RNAi) deren Expression zu reduzieren und die Funktion zu erforschen. Dafür wurde der Pilz mit fünf Haarnadel-konstrukten, mittels *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Drei Kolonien mit reduzierter Sporenbildung wurden sichtbar. Die Kolonien waren mit dem Haarnadel-konstrukt Squalene-hopene cyclase, einem Transkriptionsfaktor und dem leeren Vektor als Kontrolle transformiert. Die Kolonie welche mit dem Squalene-hopene cyclase Konstrukt transformiert war, zeigte eine veränderte Morphologie. Die niedrige Transfromationseffizienz und das späte Erscheinen von Kolonien hingen vermutlich von der Pigmentierung unseres Isolates ab. Wir nehmen an, dass das gesuchte Avirulenzgen einen Faktor kodiert, welcher bei der Modifizierung des Non-ribosomalen Peptids beteiligt ist. Neueste Analysen des Transkriptoms eines avirulenten Isolats haben zwei unserer 16 Kandidatengene bestätigt, die eine solche Funktion haben könnten. Diese zwei Kandidatengene kodieren beide ein Protein, dass Ähnlichkeit mit einer p450 Mono-oxygenase aufweist und zeigen während der Infektion *in planta* eine 5-6 fache stärkere Expression als *in vitro*.

## ABSTRACT

Apple scab is one of the most economically important fungal diseases in apple (*Malus x domestica*) resulting in major financial costs to farmers. Caused by the fungal pathogen *Venturia inaequalis*, apple scab is largely controlled nowadays with extensive fungicide applications. However, these extensive fungicide applications involve high costs, health and environmental risks. *V. inaequalis* is thought to secrete a variety of effector molecules during pathogen attack. Some of these effectors are recognized by plant resistance (*R*) genes in a gene-for-gene interaction and trigger a resistance response. Planting resistant cultivars represents a possible solution to control the disease. The durability of the resistance in the field depends on the fitness cost of the recognized effector to the virulence of the pathogen and how easily it can be mutated to evade detection. So far no effectors triggering avirulence in *V. inaequalis* have been cloned. At least one *R* gene (*Rvi1*) was shown to be carried by the generally susceptible cultivar ‘Golden Delicious’ conferring resistance to scab isolates carrying the *AvrRvi1* gene. A sequence of 330 kb has been previously sequenced by shotgun sequencing spanning the *AvrRvi1\_2.26* locus carrying the *AvrRvi1* gene. In this thesis, gene expression analysis performed with RT-PCR and hybridization assays of forty candidate genes did not allow narrowing down the putative candidate *Avr* genes. Three GC-rich islands and two distinct AT-rich regions with remnants of transposable elements were present on *AvrRvi1\_2.26*. Sequences from virulent isolates showing similarity to the *AvrRvi1\_2.26* sequence were extracted and aligned. No sequences matching the AT-rich regions could be identified. Fifty genes were predicted using de novo prediction methods. Evidence-based predictions using transcriptome information of a virulent strain supported the presence of only 35 genes in the GC-islands. 16 of these genes were found to be polymorphic representing new candidate genes. No gene encoding for a small, secreted cysteine-rich protein could be identified. However a secondary metabolite cluster consisting of a non-ribosomal peptide synthase (NRPS) and several tailoring enzymes were found. Five genes putatively belonging to this cluster were chosen to perform RNAi silencing in the avirulent *V. inaequalis* isolate 1066 using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Five hairpin constructs were generated. Only three colonies were obtained from three attempts to transform isolate 1066. One transformed with hairpin constructs to target a transcription factor, one targeting the squalene-hopene cyclase and one with the empty vector as control. The three colonies emerged late

---

and showed a reduced sporulation by 60-20 %. Initially the squalene-hopene cyclase transformed colony had a bulbous morphology. More functional analysis is required to find *AvrRvi1*. We suggest that the reduced effectiveness of the transformations could be due to the high pigmentation of *V. inaequalis* isolate 1066 and we recommend using another isolate. We hypothesize that the secondary metabolite cluster produces the avirulence determinant. Recent whole transcriptome analysis of *V. inaequalis* isolate 1066 showed two of the sixteen above mentioned candidate genes to be strongly up-regulated during infection. These two genes encode a protein similar to p450 mono-oxygenases and have an up-regulation of 6 and 5 fold *in planta*, corroborating our hypothesis.